

Identifikasi Gen eIF4G asal *Oryza rufipogon* pada Padi Varietas Inpari HDB dan Inpari Blas

Identification of eIF4G Gene of *Oryza rufipogon* origin on Rice Varieties Inpari HDB and Inpari Blas

Ifa Manzila* dan Tri Puji Priyatno

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi
dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor 16111

ABSTRAK

Akresi padi liar *Oryza rufipogon* diketahui memiliki gen ketahanan terhadap penyakit tungro yang telah dimanfaatkan untuk perakitan varietas padi tahan tungro khususnya terhadap *rice tungro spherical virus* (RTSV). Namun hingga saat ini gen pengendali sifat ketahanan tersebut belum teridentifikasi. Gen putatif yang terkait dengan sifat ketahanan terhadap RTSV sudah diidentifikasi pada varietas Utri Merah sebagai *eukaryote Translation Initiation Factor 4 Gamma* (eIF4G). Penelitian bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi gen eIF4G pada varietas-varietas Inpari HDB dan Inpari Blas menggunakan primer spesifik yang dirancang berdasarkan runutan basa nukleotida gen eIF4G varietas Utri Merah. Gen diamplifikasi dengan metode PCR dan DNA hasil amplifikasi dirunut serta dianalisis secara *in silico*. Ketahanan varietas Inpari HDB, Inpari Blas, dan *O. rufipogon* terhadap 3 isolat virus tungro diuji dalam percobaan rumah kaca. Pengujian dilakukan sesuai standar *international rice testing nursery* menurut IRRI. Kedua varietas dan *O. rufipogon* menunjukkan respons tahan terhadap infeksi virus tungro. PCR menggunakan primer spesifik gen eIF4G berhasil mengamplifikasi target gen berukuran ~300 pb pada 2 varietas Inpari dan tetuanya (*O. rufipogon*). Analisis runutan DNA gen eIF4G menunjukkan homologi mencapai 100% diantara varietas Inpari HDB, Inpari Blas, dan *O. rufipogon*; dan 93% terhadap gen *eIF4G* varietas Utri Merah. Berdasarkan penjarangan nukleotida ditemukan delesi sebanyak 4 nukleotida dan 16 nukleotida yang berbeda antara Utri Merah dengan 2 varietas Inpari dan *O. rufipogon*. Perbedaan nukleotida tersebut mengakibatkan ada 1 delesi asam amino dan 4 asam amino yang berbeda pada 2 varietas Inpari dan *O. rufipogon* dibandingkan dengan Utri Merah.

Kata kunci: *eukaryotic translation initiation factor4 gamma*, gen ketahanan resesif, tungro.

ABSTRACT

Wild rice accession *Oryza rufipogon* is known as a source of tungro resistance genes and has been used to develop tungro resistant varieties, especially against *rice tungro spherical virus* (RTSV). However the genes have not been identified yet. Previously, an *eukaryotic Translation Initiation Factor* (eIF4G) was identified as a putative gene associated with recessive resistance gene against RTSV in Utri Merah variety. The research was aimed to detect and identify the eIF4G gene on rice var. Inpari HDB and var. Inpari Blas using specific primer that was designed based on Utri Merah eIF4G gene sequences. The resistance respons of both Inpari varieties and *O. rufipogon* against 3 tungro virus isolates were conducted in the green house trial. Assays were done based on *international rice testing nursery* according to IRRI. The eIF4G gene is amplified by PCR and the amplicon was directly sequenced, then analysed in silico. The results showed that all 3 varieties are classified as resistant against tungro virus

*Alamat penulis korespondensi: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Tel: 0251-8337975, Faks: 0251-8338820; Surel: ifamanzila@gmail.com

isolates. PCR was successfully amplified the eIF4G gene with size ~300 bp in both of varieties and their parent *O. rufipogon*. The nucleotides homology of eIF4G among those 2 varieties and *O. rufipogon* is up to 100%, while the homology to Utri Merah was 93%. There were 4 nucleotides deletion and 16 nucleotides differences between Utri Merah and those 2 varieties and *O. rufipogon*, respectively. Those nucleotide differences lead to deletion of 1 amino acid and 4 amino acids different between both Inpari varieties and *O. rufipogon* in comparison with corresponding amino acid in Utri Merah.

Key words: *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma*, recessive resistance gene, tungro

PENDAHULUAN

Penyakit tungro sudah lama dikenal sebagai salah satu penyakit penting pada tanaman padi di Indonesia. Rata-rata luas serangan tungro dalam 10 tahun terakhir mencapai 10 861 ha dan puso 227 ha, dengan luas serangan tertinggi terjadi pada tahun 2011 yang mencapai 16 027 ha dan puso 392 ha (Ditlin 2015). Penyakit tungro merupakan penyakit yang sangat kompleks karena penyebab penyakit melibatkan dua jenis virus yang berbeda, yaitu *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV; *Badnavirus*) dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV; *Waikavirus*) (Cruz *et al.* 1999).

Berbagai upaya pengendalian penyakit tungro secara fisik dan kimia telah dilakukan, tetapi pengendalian dengan varietas tahan dianggap yang paling efektif (Darajat *et al.* 2004). Beberapa varietas padi tahan tungro sudah dilepas, seperti Tukad Unda, Tukad Petanu, Tukad Balian, Kalimas, dan Bondoyudo (Darajat *et al.* 2004; Ladja dan Widiarta 2012). Namun varietas tersebut bersifat spesifik lokasi (Ladja dan Widiarta 2012) sehingga tidak berkembang luas di masyarakat. Kebanyakan varietas elit yang berkembang di sentra-sentra produksi padi ialah varietas yang tidak tahan tungro. Oleh karena itu, perbaikan sifat ketahanan varietas elit perlu dilakukan.

Sumber gen tahan tungro sudah banyak diketahui dari sejumlah plasma nutfah padi lokal, seperti Cempa Siam, Cempo Nyonya, Horeng, Kangkungan, dan Mayang Terurai (BB Padi 2010), meski belum jelas mekanisme sifat ketahanannya. Aksesori padi liar *Oryza rufipogon*, *O. officinalis*, *O. longistaminata*, dan *O. ridleyi* diidentifikasi

memiliki gen ketahanan terhadap tungro (Kobayashi *et al.* 1993; Angeles *et al.* 2008). Khush *et al.* (2004) telah menggunakan *O. rufipogon* untuk merakit varietas Matatag 9 yang tahan tungro dari hasil persilangannya dengan IR64 di Filipina. Menurut Shibata *et al.* (2007), ketahanan yang diturunkan dari *O. rufipogon* pada Matatag 9 adalah kombinasi sifat tahan terhadap serangga vektor melalui mekanisme antibiosis dan toleransi terhadap RTSV. Di Indonesia, 2 Varietas Unggul Baru (VUB) padi (Inpari HDB dan Inpari Blas) hasil persilangan *O. rufipogon* dan IR64 juga dilaporkan tahan tungro (Manzila *et al.* 2013). Tetapi gen ketahanan tungro dari *O. rufipogon* belum diidentifikasi hingga saat ini.

Pada varietas Utri Merah yang tahan RTSV, sifat ketahanannya dikendalikan oleh gen monogenik resesif yang berlokasi pada kromosom 7 (Choi *et al.* 2009). Lee *et al.* (2010) kemudian memetakan lebih lanjut keberadaan gen resesif tersebut dan berhasil mengidentifikasi fragmen gen resesif *tungro spherical virus (tsv1)* berukuran 200 kb di kawasan antara 22.05 Mb dan 22.25 Mb yang berkaitan dengan gen untuk faktor inisiasi translasi 4G (*Eukaryote Translation Initiation Factor 4 Gamma*: eIF4G). Keterlibatan faktor-faktor inisiasi translasi tanaman dalam mekanisme gen ketahanan resesif terhadap virus patogen sudah banyak dilaporkan (Lellis *et al.* 2002). Hampir setengah dari 200 gen-gen resisten tanaman terhadap virus, khususnya dari genus *Potyvirus*, adalah gen-gen resesif yang mengkodekan *translation initiation factors* (Hwang *et al.* 2013). Protein eIF4G dilaporkan berinteraksi dengan *genom-linked viral proteins* (Vpg) dari *Potyvirus* yang memanfaatkan interaksi ini untuk proses infeksi pada sel inang (Kang *et al.*

2005; Miyoshi *et al.* 2006; German-Retana *et al.* 2008). Gangguan pada interaksi antara faktor translasi dan Vpg *Potyvirus* menjadi mekanisme dasar sifat ketahanan gen-gen resesif (Leonard *et al.* 2000; Yeam *et al.* 2007).

Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi gen pengendali faktor inisiasi translasi 4G pada varietas Inpari HDB dan Inpari Blas dari turunan *O. rufipogon*. Artikel ini merupakan laporan pertama terkait faktor inisiasi translasi dari *O. rufipogon* yang diduga berperan penting pada sifat ketahanan RTSV terhadap varietas Inpari HDB dan Inpari Blas.

BAHAN DAN METODE

Uji Ketahanan Tanaman Padi

Tanaman padi yang digunakan untuk identifikasi gen ketahanannya terhadap tungro ialah var. Inpari HDB, Inpari Blas dan padi liar *O. rufipogon* (No. aksesori IRGC105491). Sebelumnya, tanaman padi tersebut telah diketahui bersifat tahan tungro berdasarkan pengujian dengan galur tungro Bogor, Sumedang dan Bali menggunakan varietas pembanding Utri Merah yang tahan dan TN1 yang rentan (Tabel 1).

Pengujian ketahanan dilakukan sesuai standar *international rice testing nursery* menurut IRRI (1996). Setiap tanaman uji ditanam 2 baris dengan 10 bibit per baris dan di antaranya ditanam varietas pembanding. Setelah bibit berumur 2 minggu diinfestasi 2 ekor serangga wereng hijau per tanaman yang sebelumnya telah melalui periode makan akuisisi selama 24 jam pada sumber inokulum virus tungro. Pengamatan gejala dilakukan pada 15 dan 30 hari setelah inokulasi terhadap penghambatan tinggi tanaman, insidensi dan keparahan penyakit. Pengamatan insidensi penyakit tungro dilakukan pada semua rumpun tanaman, dan tingkat keparahan penyakit menggunakan *standard evaluation system for rice* (SESR) (IRRI 1996).

Ekstraksi DNA

Isolasi total DNA daun padi dilakukan dengan metode yang diadopsi dari Pitch dan

Schubert (1993). Sampel daun sehat diambil dari tanaman yang berumur 1 minggu setelah semai. Daun dipotong kecil-kecil dan digerus hingga lumat menggunakan mortar yang telah didinginkan. Ekstrak daun disuspensikan dengan 1000 μ L bufer ekstraksi (0.05 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, 0.5 M NaCl, pH 8), 100 μ L SDS 10% dan 100 μ L *polyvinylpyrrolidone* (PVP) 10% di dalam tabung dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit. Selanjutnya, ditambahkan 120 μ L potassium asetat 5 M pH 5.5 dan suspensi daun diinkubasi di dalam es selama 30 menit sebelum disentrifugasi pada kecepatan 10 000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung yang baru dan ditambahkan 800 μ L larutan kloroform dan isoamilalkohol dengan perbandingan 24:1. Tabung dibolak-balikkan hingga larutan tercampur merata dan disentrifugasi kembali. Supernatan lapisan atas dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 2 \times lipat volume supernatan. Setelah diinkubasi selama \pm 1 jam di dalam lemari pendingin (-20 °C), supernatan disentrifugasi pada kecepatan 10 000 rpm selama 15 menit hingga DNA terendapkan pada bagian bawah tabung. Supernatan dibuang dan pelet DNA ditambahkan 800 μ L etanol 70% lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10 000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan selama \pm 1 jam sebelum diresuspensi dengan 50 μ L ddH₂O untuk digunakan sebagai templat PCR.

Perancangan Primer

Gen eIF4G (no. aksesori BAD30897) berukuran 5571 pb yang terdiri atas 5 ekson (4503 pb) dan 4 intron (1068 pb) (NCBI 2015). Ekson sepanjang 4503 pb mengkode protein eIF4G yang terdiri atas 1501 asam amino. Pasangan primer SF (5'-ATTGTTGCCTCAGAGAGTCTTG-3') (posisi nt 2144-2166) dan SR (5'-GGAATTGGTGATCAACAACCTT-3') (posisi nt 2439-2418) dirancang dari runutan gen ketahanan pada Utri Merah. Letak primer pada ekson ke-3 dari gen eIF4G diantara posisi nukleotida 2144-2439 (Gambar 1a).

Ekspektasi DNA hasil amplifikasi adalah ± 294 pb (~ 300 pb pada elektroforesis), mengkodekan 98 asam amino pada posisi asam amino 721-818 dari protein eIF4G (Gambar 1b).

Amplifikasi Gen eIF4G

Amplifikasi gen eIF4G dengan PCR menggunakan pasangan primer spesifik SF dan SR. Reaksi PCR dilakukan pada volume total 20 μ L yang mengandung 1 μ L bufer PCR 10 \times , 1.5 μ L $MgCl_2$ 50 mM, 0.5 μ L dNTP 10 mM, primer *forward* dan *reverse* 100 nM masing-masing 1 μ L, 1 μ L DNA 200 ng, 0.5 μ L Taq polymerase (5 U μ L⁻¹), dan ddH₂O sampai volume total reaksi 20 μ L. Proses amplifikasi gen dengan program PCR sebanyak 30 siklus dilakukan sebagai berikut, pradenaturasi pada suhu 94 °C selama 10 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, aneling pada suhu 60 °C selama 45 detik, pemanjangan pada suhu 72 °C selama 1 menit, dan pasca pemanjangan primer pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil amplifikasi gen dielektroforesis dalam larutan bufer TAE dengan tegangan 90 volt selama 30 menit, lalu pita DNA divisualisasi menggunakan *UV Transilluminator* setelah direndam dalam larutan etidium bromida 0.1% (w/v) selama 15 menit.

Peruntutan DNA .

Pita DNA hasil PCR berukuran ~ 300 pb diisolasi dari gel agarosa dan dipurifikasi menggunakan kit Agarose Gel DNA

Extraction (Qiagen, USA) sesuai protokol. DNA hasil purifikasi diruntut di First Base di Singapura. Pita DNA yang diruntut berasal dari hasil amplifikasi DNA var. Inpari HDB, Inpari Blas dan *O. rufipogon* menggunakan primer SF dan SR.

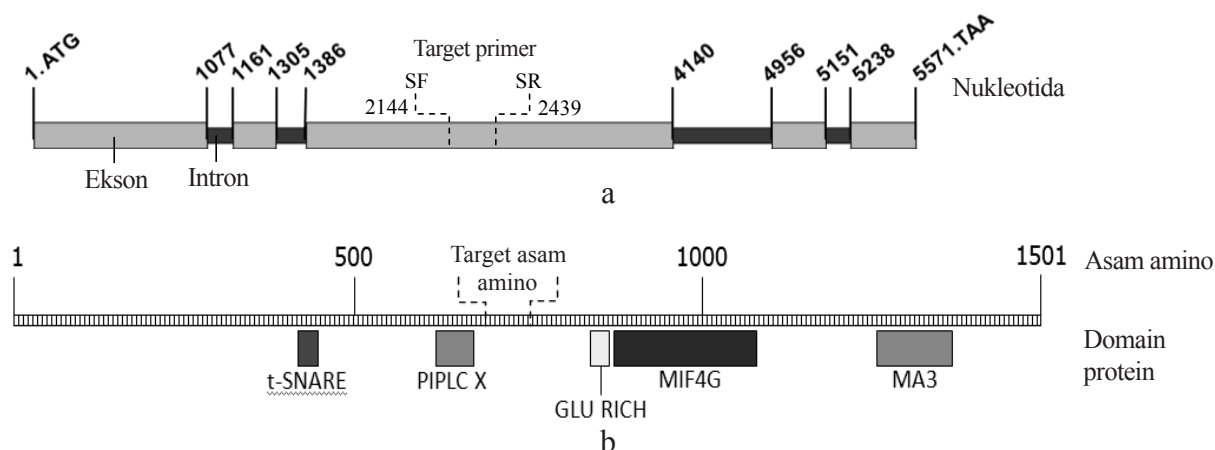
Analisis *in silico*

Analisis *in silico* runutan DNA dilakukan dengan aplikasi *online*. Analisis tingkat kesetaraan runutan dilakukan menggunakan *database* dalam server NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analisis *multiple alignment* dilakukan dengan server *ClustalW* (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) dan *Boxshade* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html), sedangkan analisis motif dan domain protein dilakukan menggunakan sejumlah aplikasi yang tersedia di *Exspassy tools* (<http://www.expasy.org/tools>).

HASIL

Respons ketahanan var. Inpari HDB, Inpari Blas dan *O.rufipogon* terhadap infeksi 3 isolat tungro menunjukkan respons tahan jika dibandingkan dengan TN1 (Tabel 1).

Hasil PCR menunjukkan bahwa pasangan primer SF/SR berhasil mengamplifikasi fragmen DNA gen eIF4G dari genom padi var. Inpari HDB, Inpari Blas, *O. rufipogon*, dan Utri Merah, kecuali TN1. Produk PCR berupa pita tunggal DNA yang berukuran ~ 300 pb



Gambar 1 a. Skematika gen eIF4G dan; b, protein eIF4G dari *O. sativa* grup Japonica (No. aksesori BAD30897).

sesuai dengan ekspektasi ukuran DNA target (Gambar 2).

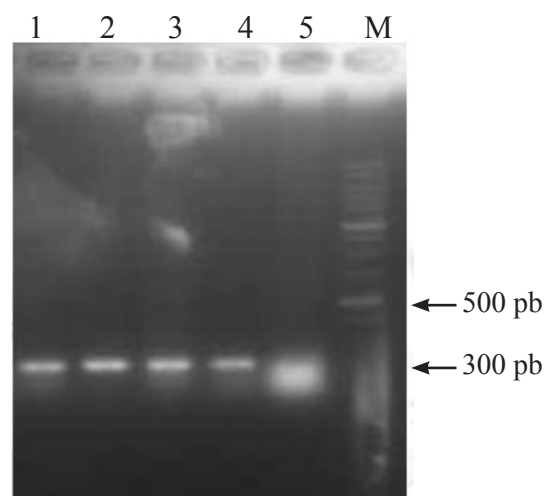
Analisis runutan DNA gen eIF4G terhadap basis data gen di Genbank dengan BLAST menunjukkan bahwa fragmen tersebut merupakan runutan nukleotida parsial dari gen eIF4G dengan tingkat homologi 93% terhadap gen var. Utri Merah, NIL TW16 (turunan Utri Merah), var. TN1, dan *O. sativa* group *Japonica* (Tabel 2). Tingkat homologi gen tersebut di antara Inpari HDB, Inpari Blas dan *O. rufipogon* mencapai 100%.

Hasil analisis penyejajaran menunjukkan bahwa gen eIF4G dari Inpari HDB dan Inpari Blas tidak berbeda dengan gen eIF4G dari *O. rufipogon*. Hal ini mengonfirmasi bahwa gen eIF4G pada Inpari HDB dan Inpari Blas berasal dari *O. rufipogon* yang menjadi salah satu tetuanya (Gambar 3; Gambar 4). Fragmen tersebut diduga bukan dari IR64 yang juga merupakan tetua Inpari HDB dan Inpari Blas karena pasangan primer SF/SR tidak mampu mengamplifikasi gen tersebut dari genom IR64 (Data tidak ditampilkan).

Perbandingan antara Utri Merah dan *O. japonica*, dengan gen eIF4G *O. rufipogon* menunjukkan ada 4 delesi nukleotida; 3 nukleotida pada posisi 2173-2175 dan 1 nukleotida pada posisi 2428-2429 dan 16 titik mutasi pada runutan nukleotida. Hal ini menyebabkan delesi 1 asam amino dan perbedaan 4 asam amino pada kedua varietas inpari dan *O. rufipogon* (Gambar 3; Gambar 4). Protein eIF4G *O. rufipogon* mengalami delesi asam amino serin (S) posisi 671 dan mutasi alanin/valin (A/V) posisi 673, treonin/alanin (T/A) posisi 723, glutamine/prolin (Q/P) posisi 742, dan isoleusin/prolin (I/V) posisi 754 (Gambar 4).

PEMBAHASAN

Gen ketahanan tungro pada *O. rufipogon* sudah lama dilaporkan (Shibata *et al.* 2007) dan digunakan sebagai sumber gen dalam perakitan varietas tahan tungro, seperti Matatag di Filipina (Khush *et al.* 2004), Inpari HDB, dan Inpari Blas Indonesia (Manzila *et al.* 2013), tetapi gen yang berperan terhadap sifat ketahanan tersebut belum diketahui. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen eIF4G diduga menjadi salah satu gen penting yang berperan pada sifat ketahanan terhadap tungro pada *O. rufipogon* yang telah diturunkan pada kedua varietas padi tersebut. Fragmen gen ini sama dengan yang telah dilaporkan oleh Lee *et al.* (2010) pada Utri Merah, tetapi tingkat homologinya 93%. Ditemukan ada dileksi dan sejumlah perbedaan nukleotida tunggal pada gen eIF4G *O. rufipogon* dibandingkan dengan eIF4Gtsv1 dari Utri Merah dan *O. japonica*.



Gambar 2 Hasil elektroforesis gen eIF4G yang diampilifikasi dengan pasangan primer SF dan SR pada gel agarosa. M, Marker 100 pb; 1, Inpari HDB; 2, Inpari Blas; 3, Uthri Merah; 4, *Oryza rufipogon*; 5, TN1.

Tabel 1 Skor keparahan penyakit tungro pada var. Inpari HDB dan Inpari Blas

Varietas	Isolat tungro			Reaksi
	Sumedang	Bogor	Bali	
Inpari HDB	1.0	0.8	2.6	Tahan
Inpari Blas	1.0	1.6	1.2	Tahan
Utri Merah	1.0	1.0	1.0	Tahan
<i>Oryza rufipogon</i>	1.0	1.0	1.0	Tahan
TN1	8.6	8.6	7.8	Rentan

Tabel 2 Analisis nukleotida gen ketahanan dari padi varietas Inpari HDB, Inpari Blas, dan O. rufipogon menggunakan program BLAST N

No. Akses	Deskripsi	Identitas maksimum
GQ203289	Runutan parsial CDS gen <i>eukaryotic translation initiation factor 4g</i> dari <i>Oryza sativa</i> grup <i>Indica</i> (Utri Merah 16682)	93%
GQ203290	Runutan parsial CDS gen <i>eukaryotic translation initiation factor 4g</i> dari <i>Oryza sativa</i> grup <i>Indica</i> (Kultivar TW16)	93%
GQ203288	Runutan parsial CDS gen <i>eukaryotic translation initiation factor 4g</i> dari <i>Oryza sativa</i> grup <i>Indica</i> (Taichung Native 1)	93%
BAD30897	<i>Putative eukaryotic translation initiation factor 4G</i> dari <i>Oryza sativa</i> grup <i>Japonica</i>	93%
AK069301	<i>Oryza sativa Japonica</i> grup <i>cDNA clone: J023014L06</i>	93%

Inpari Blas	2144	ATTGGTGCCTCAGAGAGTCTTGATAGTTC---AATTGTTGATCATGAGCTACCAGACGAA
<i>O. rufipogon</i>	2144	ATTGGTGCCTCAGAGAGTCTTGATAGTTC---AATTGTTGATCATGAGCTACCAGACGAA
Inpari HDB	2144	ATTGGTGCCTCAGAGAGTCTTGATAGTTC---AATTGTTGATCATGAGCTACCAGACGAA
Utri Merah (GQ203289)	2144	ATTGGTGCCTCAGAGAGTCTTGATAGTTCCTTCAATTGCTGATCATGAGCTACCAGACGAG
<i>O. japonica</i> (BAD30897)	2144	ATTGGTGCCTCAGAGAGTCTTGATAGTTCCTTCAATTGCTGATCATGAGCTACCAGACGAG
Inpari Blas	2204	TCCTCTGCAAAGGAGGCTAATATGGGTGAGGACGAGGGAAAGAAAAGGTTGAGCTTGAT
<i>O. rufipogon</i>	2204	TCCTCTGCAAAGGAGGCTAATATGGGTGAGGACGAGGGAAAGAAAAGGTTGAGCTTGAT
Inpari HDB	2204	TCCTCTGCAAAGGAGGCTAATATGGGTGAGGACGAGGGAAAGAAAAGGTTGAGCTTGAT
Utri Merah (GQ203289)	2204	TCCTCGGAAAAGGAGGTTAATATGGGTGAGGACGAGGGAAAGAAAAGGTTGAGCTTGAT
<i>O. japonica</i> (BAD30897)	2204	TCCTCGGAAAAGGAGGTTAATATGGGTGAGGACGAGGGAAAGAAAAGGTTGAGCTTGAT
Inpari Blas	2265	GATTGGGAAGATGCGCGCAGAAATGTCTACTCCAAAGTTGGAGAGGTCTGATTCCAGCAAT
<i>O. rufipogon</i>	2265	GATTGGGAAGATGCGCGCAGAAATGTCTACTCCAAAGTTGGAGAGGTCTGATTCCAGCAAT
Inpari HDB	2265	GATTGGGAAGATGCGCGCAGAAATGTCTACTCCAAAGTTGGAGAGGTCTGATTCCAGCAAT
Utri Merah (GQ203289)	2265	GATTGGGAAGACGCTGCAGAAATGTCTACTCCAAAGTTGGAGAGGTCTGATTCCAGCAAT
<i>O. japonica</i> (BAD30897)	2265	GATTGGGAAGACGCTGCAGAAATGTCTACTCCAAAGTTGGAGAGGTCTGATTCCAGCAAT
Inpari Blas	2325	CAGGCAACCGAAGCTAATGGGAGGAAGAGATATTCCGCGGATTTTTTGCTAACTTTAGCG
<i>O. rufipogon</i>	2325	CAGGCAACCGAAGCTAATGGGAGGAAGAGATATTCCGCGGATTTTTTGCTAACTTTAGCG
Inpari HDB	2325	CAGGCAACCGAAGCTAATGGGAGGAAGAGATATTCCGCGGATTTTTTGCTAACTTTAGCG
Utri Merah (GQ203289)	2325	CAAAACAACCGAAGCTAATGGGAGGAAGAGATATTCCGCGGATTTTTTGCTAACTTTAGCA
<i>O. japonica</i>	2325	CAAAACAACCGAAGCTAATGGGAGGAAGAGATATTCCGCGGATTTTTTGCTAACTTTAGCA
Inpari Blas	2385	CCAAGTTGTACTAATCTTCTGTTGGTTTCCAGATGGTTGAGTTCGCCAGCGTTCTGTTC
<i>O. rufipogon</i>	2385	CCAAGTTGTACTAATCTTCTGTTGGTTTCCAGATGGTTGAGTTCGCCAGCGTTCTGTTC
Inpari HDB	2385	CCAAGTTGTACTAATCTTCTGTTGGTTTCCAGATGGTTGAGTTCGCCAGCGTTCTGTTC
Utri Merah (GQ203289)	2385	CAGAGTTGTACTAATCTTCTGTTGGTTTCCAGATGATTGAGTACGCCAGCGTTCTGTTC
<i>O. japonica</i> (BAD30897)	2385	CAGAGTTGTACTAATCTTCTGTTGGTTTCCAGATGATTGAGTACGCCAGCGTTCTGTTC
Inpari Blas	2445	CCTACTGCGTTTTTC
<i>O. rufipogon</i>	2445	CCTACTGCGTTTTTC
Inpari HDB	2445	CCTACTGCGTTTTTC
Utri Merah (GQ203289)	2445	CCTA-----
<i>O. japonica</i> (BAD30897)	2445	CCTA-----

Gambar 3 Hasil analisis penyandingan runutan nukleotida gen eIF4G dengan *software* Clustal W.

INPARI BLAS	660	FIGASESLDSS-IVDHELPDESSEKEVNMGEDEGKKKVELDDWEDAAEMSTPKLERSDSS
<i>O. rufipogon</i>	660	FIGASESLDSS-IVDHELPDESSEKEVNMGEDEGKKKVELDDWEDAAEMSTPKLERSDSS
INPARI HDB	660	FIGASESLDSS-IVDHELPDESSEKEVNMGEDEGKKKVELDDWEDAAEMSTPKLERSDSS
Utri Merah (GQ203289)	660	FIGASESLDSS-IVDHELPDESSEKEVNMGEDEGKKKVELDDWEDAAEMSTPKLERSDSS
<i>O. japonica</i> (BAD30897)	660	FIGASESLDSS-IVDHELPDESSEKEVNMGEDEGKKKVELDDWEDAAEMSTPKLERSDSS
INPARI HDB	721	NQATEANGRKRYSRDFLLTLAPSCNTNLPVGFQMI
<i>O. rufipogon</i>	721	NQATEANGRKRYSRDFLLTLAPSCNTNLPVGFQMI
INPARI HDB	721	NQATEANGRKRYSRDFLLTLAPSCNTNLPVGFQMI
Utri Merah (GQ203289)	721	NOTTEANGRKRYSRDFLLTLAQSCNTNLPVGFQMI
<i>O. japonica</i> (BAD30897)	721	NOTTEANGRKRYSRDFLLTLAQSCNTNLPVGFQMI

Gambar 4 Hasil analisis penyandingan runutan asam amino protein eIF4G dengan *software* Clustal W.

Gen eIF4G merupakan *house keeping gene* yang ada pada semua organisme eukariot (Patrick and Browning 2012). Peran utama protein yang dikodekan oleh gen eIF4G di dalam sel tumbuhan ialah untuk menginisiasi proses translasi protein dan pengaturan ekspresi sejumlah gen (Marintchev dan Wagner 2005). Protein eIF4G diperlukan oleh mRNA untuk membentuk ikatan dengan subunit ribosomal 40S dan memindai *5'-untranslated region* mRNA hingga ditemukannya *start codon*. Tetapi sejumlah virus dilaporkan memanfaatkan eIF4G untuk proses translasi dan ekspresi genomnya dalam melengkapi proses siklus hidup dan infeksi inangnya (Hwang *et al.* 2013). Sebagai parasit obligat dengan struktur partikel yang sangat sederhana, virus tidak memiliki kelengkapan organel untuk bisa hidup secara mandiri sehingga harus tergantung pada inang (Nagy dan Pogany 2011). Untuk melengkapi keseluruhan siklus hidupnya, virus patogen dari genus *Potyvirus* menggunakan protein eIF4G untuk membantu proses transkripsi dan translasi genomnya. Menurut Lellis *et al.* (2002) ada 3 mekanisme pemanfaatan protein eIF4G oleh virus patogen, yaitu inisiasi proses translasi, stabilisasi genom virus, dan proses lalu lintas partikel virus di dalam sel (*intracellular trafficking*).

Mutasi pada gen eIF4G *O. rufipogon* diduga menyebabkan perubahan interaksi antara RTSV dengan inangnya. Virus patogen tidak mampu lagi mengenali protein eIF4G inang yang menjadi target untuk membantu dalam proses infeksi. Albar *et al.* (2006) melaporkan polimorfisme nukleotida tunggal pada gen RMYV1 yang mengodekan eIF(iso)4G dari padi *O. sativa* Gigante dan *O. glaberrima* yang tahan terhadap *Rice yellow mottle virus* (RYMV) dibandingkan tanaman yang rentan. Pada *Arabidopsis thaliana*, mutasi pada gen eIF4G^{cum2} mengakibatkan CMV tidak mampu bereplikasi meski mutasinya hanya berupa substitusi (Yoshii *et al.* 2004).

Protein eIF4G dari *O. sativa* Japonica (no. aksesori BAD30897) memiliki 5 domain utama, yaitu *middle portion of eIF4G* (MIF4G), *methyl adenine* (MA-3), *Phosphatidylinositol-specific*

phospholipase X-box (PIPLC-X), *t-SNARE coiled-coil homology* (T-SNARE) dan *GLU_RICH Glutamic acid-rich* (GLU-Rich) (Sasaki *et al.* 2002). Dua domain terpanjang ialah MIF4G pada posisi asam amino 892-1115 yang berfungsi untuk mengikatkan RNA dengan protein eIF4A dan MA-3 pada posisi asam amino 1313-1427 yang merupakan situs pengikatan kedua. Tetapi fragmen gen yang berhasil diamplifikasi dengan primer SF/SR berada diluar 5 domain tersebut dan memiliki motif protein yang terkait dengan fosforilasi kinase (serin/treonin) dan *Arg-Gly-Asp (RGD)-cell attachment*. Motif fosforilasi kinase enzim kinase dalam mengkatalis reaksi fosforilasi terhadap jenis protein tertentu pada residu serina/treonina termasuk faktor transkripsi yang terdapat pada inti sel (Zhao *et al.* 2007). Motif *Arg-Gly-Asp (RGD)-cell attachment* berfungsi mengenali reseptor integrin dalam proses interaksi sel patogen.

Berdasarkan penelitian ini, gen eIF4G berhasil dideteksi dan diidentifikasi dari varietas Inpari HDB, Inpari Blas dan *O. rufipogon* dengan homologi nukleotida gen parsial mencapai 100%. Gen ini diduga kuat berperan dalam sifat ketahanan kedua varietas terhadap infeksi RTSV. Namun belum diketahui mekanisme gen eIF4G yang terdelesi dan ada polimorfisme nukleotida tunggal mampu menghambat infeksi RTSV, sebagai salah satu penyebab penyakit tungro pada varietas Inpari HDB dan Inpari Blas. Selain itu belum diketahui apakah gen eIF4G menjadi satu-satunya gen yang berperan terhadap sifat ketahanan terhadap tungro atau ada peran gen-gen lainnya, sehingga sifat *durability* ketahanan Inpari HDB dan Inpari Blas dapat diketahui. Oleh karena itu kajian yang lebih mendalam perlu dilakukan untuk mengetahui peran penting gen tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari DIPA Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen) TA. 2015 dengan nomor DIPA 1798.001.003. Terima kasih disampaikan

kepada Ida Hanarida Soemantri dan Dwinita Wikan Utami yang telah memberikan material penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Albar L, Bangratz-Reyser M, Hèbrard E, Ndjondjop MN, Jones M, Ghesquière A. 2006. Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *Plant J*. 47: 417-426. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02792.x>.
- Angeles ER, Cabunagan RC, Tabien RE, Khush GS. 2008. Resistance to tungro vectors and viruses. Di dalam: Tiongco ER, Angeles ER, Sebastian LS, editor. *Rice Tungro Virus Disease: A Paradigm in Disease Management*. Science City of Munoz, Nueva Ecija (PH): Philippine Rice Research Institute and Honda Research Institute Japan Co. Ltd. hlm 117-141.
- Balai Besar Padi. 2010. Laporan tahunan hasil penelitian. Sukamandi (ID). Balai Besar Padi.
- Choi IR, Cabauatan PQ, Cabunagan RC. 2009. Rice Tungro Disease. Rice Fact Sheet, IRRI, Sep. 2009: 1-4.
- Cruz FCStA, Boulton MI, Hull R, Azzam O. 1999. Agroinoculation Allows the Screening of Rice for Resistance to *Rice Tungro Bacilliform Virus*. *J Phytopathol*. 147(11-12):653-659. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.00452.x>.
- Darajat AA, Widiarta IN, Jumanto H. 2004. Prospek perbaikan varietas padi tahan virus tungro dan serangga wereng hijau. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*; Sept 7-8 2004; Makassar (ID): Pusat Puslitbangtan, Badan Litbang Pertanian. Hlm 27-35.
- [Ditlin] Direktorat Perlindungan Hortikultura. 2015. Luas serangan OPT utama pada tanaman padi. www.tanamanpangan.pertanian.go.id. [diakses tanggal 1 Juni 2015.].
- Ladja FT, Widiarta IN. 2012. Varietas unggul baru padi untuk mengantisipasi ledakan penyakit tungro. *Iptek Tan Pangan*. 7(1):18-24.
- German-Retana S, Walter J, Le Gall O. 2008. *Lettuce mosaic virus*: from pathogen diversity to host interactions. *Mol Plant Pathol*. 9: 127-136. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.804>.
- Hwang JN, Chang SO, Kang BC. 2013. Translation elongation factor1B(eEF1B) is an essential host factor for *Tobacco mosaic virus* infection in plants. *Virology*. 439: 105-114. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.004>.
- IRRI. 1996. *Standard evaluation system for rice*. Los Banos (PH): IRRI.
- Kang BC, Yeam I, Jahn MM. 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol*. 43:581-621. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.011205.141140>.
- Kobayashi N, Ikeda R, Vaughan DA. 1993. Resistance to rice tungro viruses in wild species of rice (*Oryza* spp.). *Jpn J Breed*. 43:247-255. DOI: <http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs1951.43.247>.
- Khush GS, Angeles E, Virk PS, Brar DS. 2004. Breeding rice for resistance to tungro virus at IRRI SABRAO. *J Breed Gen*. 6(2):101-106.
- Lee JH, Muhsin M, Atienza GA, Kwak DY, Kim SM, De Leon TB, Angeles ER, Coloquio E, Kondoh H, Satoh K, Cabunagan RC, Cabauatan PQ, Kikuchi S, Leung H, Choi IR. 2010. Single nucleotide polymorphisms in a gene for translation initiation factor (eIF4G) of rice (*Oryza sativa*) associated with resistance to *Rice tungro spherical virus*. *Mol Plant Microb Interact*. 23(1):29-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-23-1-0029>.
- Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC. 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during *potyvirus* infection. *Curr Bio*. 12:1046-1051. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00898-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00898-9).
- Leonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF. 2000. Complex

- formation between *potyvirus* VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol.* 74(17):7730–7737. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.17.7730-7737.2000>.
- Manzila 1, TP Priyatno, I Hanarida. 2013. Ketahanan galur padi hibrida potensi hasil tinggi terhadap penyakit tungro. *J Fitopatol Indones* 9(3):77–83. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.9.3.77>.
- Marintchev A, Wagner G. 2005. eIF4G and CBP80 share a common origin and similar domain organization: implications for the structure and function of eIF4G. *Biochem* 44(37):12265–12272. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bi051271v>.
- Miyoshi H, Suehiro N, Tomoo K, Muto S, Takahashi T, Tsukamoto T, Ohmori T, Natsuaki T. 2006. Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie.* 88: 329–340. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2005.09.002>.
- Nagy PD, Pogany J. 2011. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol.* 10(2):137–149. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2692>.
- Patrick RM, Browning KS. 2012. The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: an evolutionary perspective. *Com Funct Genom.* 12:1–12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/287814>.
- Pitch U, Schubert I. 1993. Midiprep method for isolation of DNA from plants with high content of polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 21: 3328. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/21.14.3328>.
- Sasaki T, Matsumoto T, Katayose Y. 2002. *Oryza sativa* Nipponbare (GA3) genomic DNA, chromosome 7, BAC clone: OSJNBa0058I18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAD30897> [diakses 10 Jul 2015].
- Shibata Y, Cabunagan RC, Cabauatan PQ, Choi IR. 2007. Characterization of *Oryza rufipogon*-derived resistance to tungro disease in rice. *Plant Dis.* 91(11): 1386–1391. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1386>.
- Yeam I, Cavatorta JR, Ripoll DR, Kang BC, Jahn MM. 2007. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive *potyvirus* resistance in plants. *Plant Cell.* 19(9):2913–2928. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.050997>.
- Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, Yoshioka N, Kozuka R, Naito S, Ishikawa M. 2004. The *Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1* and *2* loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J Virol.* 78(12):6102–6111. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.12.6102-6111.2004>.
- Zhao X, Mehrabi R, Xu JR. 2007. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukar Cell.* 6(10): 1701–1714. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00216-07>.